

11.11.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 4月14日

REC'D 06 JAN 2000

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第106812号

WIPO PCT

出願人
Applicant(s):

武田薬品工業株式会社

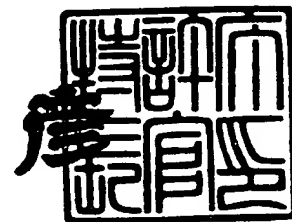
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月17日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-308770

【書類名】 特許願

【整理番号】 A99072

【提出日】 平成11年 4月14日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 07/00
C12N 15/12

【発明の名称】 新規タンパク質およびそのDNA

【請求項の数】 25

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市春日 1丁目7番地9 武田春日ハイツ 1
402号

【氏名】 日沼 州司

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市並木 3丁目17番地6 ロイヤルシティ
並木 302号

【氏名】 福住 昌司

【特許出願人】
【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】
【識別番号】 100073955

【弁理士】
【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】
【識別番号】 100110456

【弁理士】
【氏名又は名称】 内山 務

【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 平成11年特許願第 60030号

【出願日】 平成11年 3月 8日

【整理番号】 A99040

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000053

【包括委任状番号】 9721047

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】新規タンパク質およびそのDNA

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするタンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項2】実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：8、配列番号：14または配列番号：18で表されるアミノ酸配列である請求項1記載のタンパク質。

【請求項3】請求項1記載のタンパク質の部分ペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項4】配列番号：1の第81番目(Met)ないし第92番目(Phe)のアミノ酸残基を含有してなる請求項3記載の部分ペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項5】配列番号：1の第101番目(Ser)ないし第112番目(Ser)のアミノ酸残基を含有してなる請求項3記載の部分ペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項6】配列番号：1の第124番目(Val)ないし第131番目(Phe)のアミノ酸残基を含有してなる請求項3記載の部分ペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項7】請求項1記載のタンパク質の部分ペプチドのアミドまたはその塩。

【請求項8】請求項1記載のタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

【請求項9】配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15または配列番号：19で表される塩基配列を有する請求項8記載のDNA。

【請求項10】請求項3記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA。

【請求項11】配列番号：2で表される塩基配列の第241番目ないし第276番目の塩基を含有してなる請求項10記載のDNA。

【請求項 12】 配列番号：2 で表される塩基配列の第 301 番目ないし第 336 番目の塩基を含有してなる請求項 10 記載の DNA。

【請求項 13】 配列番号：2 で表される塩基配列の第 370 番目ないし第 393 番目の塩基を含有してなる請求項 10 記載の DNA。

【請求項 14】 請求項 8 または請求項 10 記載の DNA を含有する組換えベクター。

【請求項 15】 請求項 14 記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項 16】 請求項 15 記載の形質転換体を培養し、請求項 1 記載のタンパク質または請求項 3 記載の部分ペプチドを生成せしめることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の製造法。

【請求項 17】 請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩に対する抗体。

【請求項 18】 請求項 8 または請求項 10 記載の DNA または請求項 17 記載の抗体を含有してなる診断剤。

【請求項 19】 請求項 8 または請求項 10 記載の DNA に相補的または実質的に相補的な塩基配列を有し、該 DNA の発現を抑制し得る作用を有するアンチセンス DNA。

【請求項 20】 請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩を含有してなる剤。

【請求項 21】 請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩を含有してなる医薬

。 【請求項 22】 請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩を用いることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 23】請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩を含有してなる請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 24】請求項 22 記載のスクリーニング方法または請求項 23 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

【請求項 25】請求項 22 記載のスクリーニング方法または請求項 23 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項 1 記載のタンパク質、請求項 3 記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は新規タンパク質（本明細書においては、新規生理活性ポリペプチドと称する場合もある。）、その部分ペプチドおよびそれらをコードする DNA などに関する。特に、RFamide 様構造を有することを特徴とする新規タンパク質およびその部分ペプチドなどに関する。

【0002】

【従来の技術】

ペプチドは代謝、成長、生殖、恒常性維持、精神活動、生体防御など生体の機能を調節するための分子として重要な役割を担っている。これらのペプチドは細胞膜上の特異的な受容体に結合することによりその情報を細胞に伝える。これまでこのような生理活性ペプチドの多くは、その生理活性に基づいて組織抽出物等から単離されその構造が決定されてきた。また最近では受容体を利用して組織抽出物等から生理活性ペプチドを単離することもなされるようになってきた。

一方、最近のゲノムや cDNA の配列解析の急速な進展により、膨大な DNA 情報が

入手可能になった。これらのDNAの中にはこれまで未知であった生理活性ペプチドをコードするものが含まれているものと推定される。しかし生理活性ペプチドは非常に短いアミノ酸配列しか持たないものが多く、ゲノムDNA配列やExpressed Sequence Tag (EST)から、既知の生理活性ペプチドのと一部類似した配列あるいは共通のモチーフを有する未知の生理活性ペプチドを探そうとしても、類似した配列は生理活性ペプチドとは全く無関係な蛋白の遺伝子や非翻訳領域のDNA配列中にも頻繁に見出されるため、それらの中からどれが本当の生理活性ペプチドであるかどうかを確定することは非常に困難であった。

生理活性ペプチドの1種であるFMRFamideは二枚貝のピノスワスガレイの神経節より初めて単離、構造決定されたペプチドである (Price D.A. & Greenberg, M.J., Science, 197, 670-671, 1977)。その後、C末端にRFamide構造を持つペプチドやそれに類似の構造を持つペプチドが無脊椎動物で多くの種に広く分布することが分かってきた。特にセンチュウにおいては多くのRFamide構造を有するペプチドが存在していることが報告されており、しかもそれらの多くは一つの遺伝子上に複数個が連続して乗っていることが知られている (Nelson, L. S., et al., Molecular Brain Research 58, 103-111, 1998)。

一方、脊椎動物においてRFamide構造を有するFMRFamide様のペプチドとしては、鶏の脳からLPLRFamideが単離同定されているが、その遺伝子構造は未だに明らかにされていない (Dockray, G.J. et al., Nature, 305, 328-330, 1983)。また魚類では最近RFamide構造を有するペプチドとしてC-RFaが報告されている。哺乳動物におけるRFamide構造を有するペプチドとしてはウシから精製単離された2種のペプチド (Yang, H.-Y. T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 7757-7761, 1985) とそれに対応すると考えられるヒトcDNAから同定されたneuropeptide SF(NSF)およびneuropeptide AF(NAF)がある。また最近我々はRFamide構造を有するヒト、ウシ、ラットProlactin-releasing peptide (PrRP) (Hinuma, S., et al., Nature, 393, 272-276, 1998) を同定している。

FMRFamideペプチドの生理活性に関してはさまざまな報告がある。例えばFMRFamideの作用としては、心臓はくどうの促進や抑制、各種歯舌筋や内臓筋、各種牽引筋の収縮や弛緩、さらには神経細胞の過分極や脱分極等が知られている。また

PrRPに関してはプロラクチン放出促進活性が、またLPLRFamideに関しても神経細胞の刺激効果や、血圧上昇作用等が報告されている。

以上のようにRFamide構造を持つペプチドに関しては多くの重要な生理作用が報告されている。しかしNSF、NAF、PrRP以外に哺乳動物で知られているRFamideあるいはそれに類似する構造を有するペプチドが存在するかどうかは全く知られていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、未知のRFamide様構造を持つタンパク質（ペプチド）を見出し、それを利用した新たな生理活性物質を含有してなる疾患の予防・治療・診断剤の開発が望まれていた。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、EST等の配列情報を基にプライマーを作製し、ヒト胎児脳poly(A)⁺RNAを鋳型とするRT-PCRにより、新規な塩基配列を有するcDNAをクローニングすることに成功した。そして、本発明者らは、得られたcDNAにコードされるタンパク質が有用なC末端がLPLRFamide様、LPLRSamide様、LPQRFamide様またはLPLRLamide様のペプチドであることを見出し、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするタンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩、

(2) 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：8、配列番号：14または配列番号：18で表されるアミノ酸配列である上記(1)記載のタンパク質、

(3) 上記(1)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩、

(4) 配列番号：1の第81番目 (Met) ないし第92番目 (Phe) のアミノ酸残基を含有してなる上記(3)記載の部分ペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩、

(5) 配列番号：1の第101番目 (Ser) ないし第112番目 (Ser) のアミノ酸残基を含有してなる上記(3)記載の部分ペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩、

(6) 配列番号：1の第124番目 (Val) ないし第131番目 (Phe) のアミノ酸残基を含有してなる上記(3)記載の部分ペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩、

(7) 上記(1)記載のタンパク質の部分ペプチドのアミドまたはその塩、

(8) 上記(1)記載のタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

(9) 配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15または配列番号：19で表される塩基配列を有する上記(8)記載のDNA、

(10) 上記(3)記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA、

(11) 配列番号：2で表される塩基配列の第241番目ないし第276番目の塩基を含有してなる上記(10)記載のDNA、

(12) 配列番号：2で表される塩基配列の第301番目ないし第336番目の塩基を含有してなる上記(10)記載のDNA、

(13) 配列番号：2で表される塩基配列の第370番目ないし第393番目の塩基を含有してなる上記(10)記載のDNA、

(14) 上記(8)または上記(10)記載のDNAを含有する組換えベクター

(15) 上記(14)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(16) 上記(15)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のタンパク質または上記(3)記載の部分ペプチドを生成せしめることを特徴とする上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の製造法、

(17) 上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそ

これらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩に対する抗体、

(18) 上記(8)または上記(10)記載のDNAまたは上記(17)記載の抗体を含有してなる診断剤、

(19) 上記(8)または上記(10)記載のDNAに相補的または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するアンチセンスDNA、

(20) 上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはこれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩を含有してなる剤、

(21) 上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはこれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩を含有してなる医薬、

(22) 上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはこれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩を用いることを特徴とする上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはこれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(23) 上記(1)記載のタンパク質、上記(2)記載の部分ペプチドまたはこれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩を含有してなる上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはこれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(24) 上記(22)記載のスクリーニング方法または上記(23)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはこれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、および

(25) 上記(22)記載のスクリーニング方法または上記(23)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはこれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬などに関する。

【0006】

さらには、本発明は、

(26) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列である上記(1)記載のタンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩、

(27) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、①配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1～20個（好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1～20個（好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1～20個以上（好ましくは1～15個、さらに好ましくは1～5個以上、より好ましくは、1～3個以上）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列である上記(1)記載のタンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩、

(28) 上記(8)または(10)記載のDNAをコードする塩基配列とハイストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

(29) 上記(28)記載のDNAを含有する組換えベクター、

(30) 上記(29)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、

(31) 上記(30)記載の形質転換体を培養し、上記(28)記載のDNAにコードされるタンパク質を生成し、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする上記(28)記載のDNAでコードされるタンパク質またはその塩の製造法、

(32) 上記(31)記載の製造法で製造される、上記(28)記載のDNAでコードされるタンパク質またはその塩、

【0007】

(33) (i) 上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドま

たはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩にその受容体を接触させた場合と、(ii) 上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩にその受容体および試験化合物を接触させた場合における、上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の活性を測定し、比較することを特徴とする上記(22)記載のスクリーニング方法、

(34) 上記(22)記載のスクリーニング方法または上記(23)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(35) 上記(22)記載のスクリーニング方法または上記(23)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

【0008】

(36) 上記(17)記載の抗体と、被検液および標識化された上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の定量法、および

(37) 被検液と担体上に不溶化した上記(17)記載の抗体および標識化され

た上記(17)記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記(1)記載のタンパク質、上記(3)記載の部分ペプチドまたはそれらのアミドもしくはそれらのエステルまたはそれらの塩の定量法などを提供する。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質と称する）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など）に由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

【0010】

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

特に、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第22～180番目のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列などがあげられる。

本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列（例えば、配列番号：8、配列番号：14または配列番号：18で表されるアミノ酸配列など）を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のタンパク質の受容体を発現する細胞に添加することにより発現する細胞刺激活性（以下単に細胞刺激活性とする）、例えばアラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質の磷酸化、C-fosの活性化、細胞外pHの変動などがあげられる。

実質的に同質とは、それらの活性が性質的に（例、生理化学的に、または薬理的に）同質であることを示す。従って、細胞刺激活性などの活性が同等（例、約0.1～100倍、好ましくは約0.5～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

細胞刺激活性などの測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するスクリーニング方法に従って測定することができる。

【0011】

また、本発明のタンパク質としては、例えば、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1～20個（好ましくは、1～10個、さらに好ましくは、1～

5個、より好ましくは、1～3個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1～20個(好ましくは、1～10個、さらに好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～3個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1～20個(好ましくは、1～10個、さらに好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～3個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1～20個(好ましくは、1～10個、さらに好ましくは、1～5個、より好ましくは、1～3個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。

【0012】

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタンパク質は、C末端が通常カルボキシル基($-COOH$)またはカルボキシレート($-COO^-$)であるが、C末端がアミド($-CONH_2$)またはエステル($-COOR$)であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェ

ニル-C₁₋₂アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイルなどのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するヒト由来のタンパク質（図1）、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を有するヒト由来のタンパク質（図3）、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を有するウシ由来のタンパク質（図4）、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を有するラット由来のタンパク質（図5）などが用いられる。

また、本発明のタンパク質は下記の部分ペプチド等の前駆体であってもよく、この場合には、必ずしも下記の部分ペプチド等の有する活性（例、細胞刺激活性など）を有する必要はない。

【0013】

本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、細胞刺激活性（以下単に細胞刺激活性とする）、例えばアラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内

cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、C-fosの活性化、細胞外pHの変動などを有するものであればいかなるものでもよい。

本発明のタンパク質の部分ペプチドとして好ましくは、R Famide、R Samide またはR Lamide構造を有するペプチドが好ましい。

R Famide構造とは、ペプチドのC末端がArginine (アルギニン) -Phenylalanine (フェニルアラニン) -NH₂構造になっていることをいい、R Samide構造とは、ペプチドのC末端がArginine (アルギニン) -Serine (セリン) -NH₂構造になっていることをいい、R Lamide構造とは、ペプチドのC末端がArginine (アルギニン) -Leucine (ロイシン) -NH₂構造になっていることを意味する。

これらペプチドの中でも、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第81番目 (Met) ~第92番目 (Phe)、第101番目 (Ser) ~112番目 (Ser)、第124番目 (Val) ~131番目 (Phe)、第1番目 (Met) ~第92番目 (Phe)、第1番目 (Met) ~112番目 (Ser) または第1番目 (Met) ~131番目 (Phe) のアミノ酸配列を含有するペプチドなどが用いられる (特にこれらのペプチドのアミド体が好ましい)。

また、本発明の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1~5個 (好ましくは、1~3個のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1~5個 (好ましくは、1~3個) のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1~5個 (好ましくは、1~3個のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1~5個 (好ましくは、1~3個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい)。

【0014】

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基 (-COOH) またはカルボキシレート (-COO⁻) であるが、前記した本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド (-CONH₂) またはエステル (-COOR) (Rは上記と同意義を示す) であってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のタンパク質と同様に、N末端のアミノ酸残基 (例、メチオニン残基) のアミノ基が保護基で保護されて

いるもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

また、本発明の部分ペプチドは抗体作成のための抗原として用いることができるので、必ずしも細胞刺激活性などを有する必要はない。

【0015】

本発明のタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のタンパク質またはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後述するタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせるにより精製単離することができる。

【0016】

本発明のタンパク質、部分ペプチド、もしくはそれらの塩、またはそれらのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキ

シメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質またはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0017】

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応

を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

【0018】

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（C₁₋₆アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホンイル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Bc、Trt、Fmocなどが用いられる。

【0019】

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0020】

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α

ーアミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。

タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。

【0021】

本発明の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法があげられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②Schroeder および Luebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および 榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラ

フィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドまたはシグナルペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

【0022】

本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、前述した本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotalRNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、①配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15または配列番号19で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15または配列番号19で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性（例、細胞刺激活性など）を有するタンパク質をコードするDNA、②配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15または配列番号19で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15または配列番号19で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性（例、細胞刺激活性など）を有するタンパク質をコードするDNAなどであれば何れのものでもよい。

【0023】

配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15または配列番号19で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、それぞれ配列番号：2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。また、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：9で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられ、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：15で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられ、配列番号：18で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：19で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

【0024】

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来

の cDNA、前記した細胞・組織由来の cDNA ライブラリー、合成 DNA のいずれでもよい。

本発明の部分ペプチドをコードする DNA としては、例えば、①配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15 または配列番号：19 で表わされる塩基配列を有する DNA の部分塩基配列を有する DNA、または配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15 または配列番号：19 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードする DNA の部分塩基配列を有する DNA などが用いられる。

配列番号：2、配列番号：9、配列番号：15 または配列番号：19 で表わされる塩基配列とハイブリダイズできる DNA は、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

【0025】

本発明のタンパク質または部分ペプチド（以下、これらタンパク質等をコードする DNA のクローニングおよび発現の説明においては、これらタンパク質等を単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードする DNA のクローニングの手段としては、本発明のタンパク質の部分塩基配列を有する合成 DNA プライマーを用いて自体公知の PCR 法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだ DNA を本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードする DNA 断片もしくは合成 DNA を用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNA の塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutantTM-G（宝酒造（株））、MutantTM-K（宝酒造（株））などを用いて、Gapped duplex 法や Kunkel 法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0026】

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあげられる。

これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター

、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0027】

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等があげられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0028】

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*），60巻，160（1968）〕，JM103〔ヌクイレック・アシ

ップ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], J A 2 2 1 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], H B 1 0 1 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C 6 0 0 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)]などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) M I 1 1 4 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)]などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) A H 2 2, A H 2 2 R⁻, N A 8 7-1 1 A, D K D-5 D, 2 0 B-1 2、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) N C Y C 1 9 1 3, N C Y C 2 0 3 6、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) K M 7 1などが用いられる。

【0029】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが A c N P V の場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; S f 細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来の M G 1 細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来の High FiveTM細胞、*Mamestra brassicae* 由来の細胞または *Estigmene acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウイルスが B m N P V の場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞; B m N 細胞)などが用いられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711)、S f 2 1 細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞 C O S-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O 細胞と略記), d h f r 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 C H O (以下、C H O (d h f r⁻) 細胞と略記), マウス L

細胞、マウス At T-20、マウスミエローマ細胞、ラット GH3、ヒト FL 細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69 巻, 2110 (1972) やジーン (Gene), 17 巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。

【0030】

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168 巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194 巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75 巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52 巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、タンパク質をコードする DNA を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン

、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地の pH は約 5～8 が望ましい。

【0031】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含む M9 培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約 15～43℃で約 3～24 時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 30～40℃で約 6～24 時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 77 巻, 4505 (1980)] や 0.5% カザミノ酸を含有する SD 培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 81 巻, 5330 (1984)] があげられる。培地の pH は約 5～8 に調整するのが好ましい。培養は通常約 20℃～35℃で約 24～72 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した 10% ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地の pH は約 6.2～6.4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 27℃で約 3～5 日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)]などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞膜などに本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

【0032】

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適宜組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなど

の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0033】

かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のタンパク質またはその塩の存在または活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0034】

本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはそれらのエステルもしくはそれらのアミドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはそれらのエステルもしくはそれらのアミドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはそれらのエステルもしくはそれらのアミドまたはそれらの塩（以下、抗体の説明においては、これらタンパク質等を単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位に

それ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが用いられる。

【0035】

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞があげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80％程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗

体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0036】

（b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

【0037】

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

できる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン 1 に対し、約 0.1 ～ 20、好ましくは約 1 ～ 5 の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約 2 ～ 6 週毎に 1 回ずつ、計約 3 ～ 10 回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0038】

本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードする DNA（以下、アンチセンス DNA の説明においては、これらの DNA を本発明の DNA と略記する）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンス DNA としては、本発明の DNA に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該 DNA の発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンス DNA であってもよい。

本発明の DNA に実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明の DNA に相補的な塩基配列（すなわち、本発明の DNA の相補鎖）の全塩基配列あるいは

部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などがあげられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

【0039】

以下に、本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のタンパク質等と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、およびアンチセンスDNAの用途を説明する。

【0040】

(1) 本発明のタンパク質が関与する各種疾病の治療・予防剤

本発明のタンパク質は細胞刺激活性などを有しているので、本発明のタンパク質をコードするDNAに異常があったり、欠損している場合、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性脾炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性脾炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性

黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等の種々の疾病が発症する可能性が高い。

従って、本発明のタンパク質等および本発明のDNAは、例えば、上記の種々の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のタンパク質が減少あるいは欠損している患者がいる場合に、（イ）本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のタンパク質等を発現させることによって、（ロ）細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のタンパク質等を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または（ハ）本発明のタンパク質等を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質等の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のタンパク質等を上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

【0041】

本発明のタンパク質等は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル

剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質等を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80TM、HCO-50 など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

【0042】

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）に対して投与することができる。

本発明のタンパク質等の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、神経疾患の治療目的で本発明のタンパク質等を経口投与する場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき該タンパク質等を約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質等の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、神経疾患の治療目的で本発明のタンパク質等を注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該タンパク質等を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

【0043】

(2) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質等は細胞刺激活性などを有するため、本発明のタンパク質等の機能（例、細胞刺激活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩は、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘带状疱疹

ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺がん、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺がん、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用できる。

従って、本発明のタンパク質等は、本発明のタンパク質等の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、

（1）本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の機能（例えば、細胞刺激活性など）を促進する化合物もしくはその塩（以下、促進剤と略記する場合がある）、または本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の機能を阻害する化合物（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

（2）（i）本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に基質を接触させた場合と（ii）本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に基質および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、（i）と（ii）の場合における、本発明のタンパク質等の細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とするものである。

【0044】

本発明のタンパク質等の細胞刺激活性などは、自体公知の方法、例えば、Dockray, G.J. et al., Nature, 305, 328-330, 1983, Fukusumi, S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 232, 157-163, 1997, Hinuma, S., et al., Nature, 393, 272-276, 1998, Tatemoto, K., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 251, 471-476, 1998.などに記載の方法あるいはそれに準じる方法などに従って測定することができる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質等を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより本発明のタンパク質等の標品を調製する。バッファーには、pH約4~10（望ましくは、pH約6~8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどの、本発明のタンパク質等と基質との反応を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

【0045】

例えば、上記(ii)の場合における細胞刺激活性などが上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上上昇させる試験化合物を本発明のタンパク質等の細胞刺激活性などを促進する化合物として、一方、上記(ii)の場合における細胞刺激活性などが上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質等の細胞刺激活性などを阻害する化合物として選択することができる。

【0046】

本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質、部分ペプチドまたはそれらの塩を含有するものである。

【0047】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる

化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等の機能（例、細胞刺激活性など）を促進または阻害する化合物である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

【0048】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のタンパク質等を含有する医薬と同様にし、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、など）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のタンパク質等の機能を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物を約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のタンパク質等の機能を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg として）に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

一方、本発明のタンパク質等の機能を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物を約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20

mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のタンパク質等の機能を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg として）に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

【0049】

(3) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量

本発明のタンパク質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のタンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法を提供する。

上記 (ii) の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質等の N 端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質等の C 端部に反応する抗体であることが望ましい。

【0050】

また、本発明のタンパク質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質等の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab')_2$ 、 Fab' 、

あるいは F a b 画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質等の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0051】

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。

もよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質等のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0052】

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーな

どが好適に用いられる。

【0053】

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質等の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質等を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質等の濃度を定量することによって、(1)本発明のタンパク質等の濃度の減少または増加が検出された場合、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性脾炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性脾炎、肝硬変、大腸がん(結腸/直腸がん)、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性

神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質等を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質等の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

【0054】

（4）遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハ

イブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス (Genomics)），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユースエー（Proceedings of the Natinal Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年）などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現低下または過多が検出された場合は、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性脾炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性脾炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ状球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等である可能性が高いと診断することができる。

【0055】

（5）アンチセンスDNAを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺がん、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺がん、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病の治療・予防剤として使用することができる。

上記アンチセンスDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合、前記した本発明のDNAを含有する各種疾病の治療・予防剤と同様にして実施することができる。

例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺

伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

【0056】

(6) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明のタンパク質等の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ状球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ

、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の神経疾患患者（具体的疾患名を一つご記入下さい）の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

【0057】

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソル

ベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50 mol) adduct of hydrogenated castor oil)] などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5～500 mg、とりわけ注射剤では 5～100 mg、その他の剤形では 10～250 mg の上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

【0058】

(7) DNA 転移動物

本発明は、外来性の本発明のタンパク質等をコードする DNA（以下、本発明の外来性 DNA と略記する）またはその変異 DNA（本発明の外来性変異 DNA と略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明の外来性 DNA またはその変異 DNA を有する非ヒト哺乳動物、
- (2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第 (1) 記載の動物、
- (3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第 (2) 記載の動物、および
- (4) 本発明の外来性 DNA またはその変異 DNA を含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性 DNA またはその変異 DNA を有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明の DNA 転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般

に8細胞期以前)に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

【0059】

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar, SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトD

NAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

【0060】

本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、

ミオシン軽鎖 1 および 2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部 (VN P)、血清アミロイド P コンポーネント、ミオグロビン、トロポニン C、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリン A、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子 1 α (EF-1 α) のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

【0061】

上記ベクターは、DNA 転移哺乳動物において目的とするメッセンジャー RNA の転写を終結する配列 (一般にターミネーターと呼ばれる) を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各 DNA の配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスの SV40 ターミネーターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性 DNA をさらに高発現させる目的で各 DNA のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核 DNA のイントロンの一部などをプロモーター領域の 5' 上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の 3' 下流 に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物 (例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど) 由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来 DNA および市販の各種ゲノム DNA ライブラリーよりゲノム DNA の全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来 RNA より公知の方法により調製された相補 DNA を原料として取得することが出来る。また、外来性の異常 DNA は、上記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうる DNA コンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常の DNA 工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性 DNA の転移は、対象哺乳動物の胚芽

細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

【0062】

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質に関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

【0063】

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

【0064】

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
- ②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたタンパク質組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するタンパク質との関連性についての解析、
- ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- ④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
- ⑤本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

【0065】

(8) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第(1)項記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である第(1)項記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)項記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである第(4)項記載の胚幹細胞、
- (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、
- (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) ゲッ歯動物がマウスである第(8)項記載の非ヒト哺乳動物、および
- (10) 第(7)項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0066】

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させ

ることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

【0067】

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス（C57BL/6とDBA/2とのF₁）を用いて樹立したものなども良好に

用いうる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 10^6 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

【0068】

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1-10000 U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で

培養し、継代時には、例えば、トリプシン／EDTA溶液（通常0.001-0.5%トリプシン／0.1-5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン／1mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年；G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年；T. C. Doetschmanら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

【0069】

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはター

ゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

【0070】

このようにして本発明のDNAがロックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがロックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の

雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

【0071】

(8a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択す

ることができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性膵炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性膵炎、肝硬変、大腸がん（結腸／直腸がん）、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に糖負荷処置を行ない、糖負荷処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の血糖値および体重変化などを経時的に測定する。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の血糖値が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上低下した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

【0072】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物を約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg として）に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量

を投与することができる。

【0073】

(8b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

【0074】

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド (X-gal) のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損

マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-gal を含む染色液で、室温または 37℃ 付近で、約 30 分ないし 1 時間反応させた後、組織標本を 1 mM EDTA/PBS 溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZ をコードする mRNA を検出してもよい。

【0075】

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明の DNA に対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸など) や塩基 (例、有機酸など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など) との塩などが用いられる。

本発明の DNA に対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を促進し、該タンパク質の機能を促進することができるので、例えば、高血圧、自己免疫疾患、心不全、白内障、緑内障、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性肺炎、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促迫症候群、アルコール性肝炎、アルツハイマー病、喘息、動脈硬化、アトピー性皮膚炎、バクテリア肺炎、膀胱がん、骨折、乳がん、過食症、多食症、火傷治癒、子宮頸部がん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性肺炎、肝硬変、大腸がん (結腸/直腸がん)、クローン病、痴呆、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ感染症、肝不全、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、肝炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症、ホジキン病、エイズ感染症、ヒトパピローマウイルス感染症、高カルシウム血症、高コレステロール血症、高グリセリド血症

、高脂血症、感染症、インフルエンザ感染症、インシュリン依存性糖尿病（I型）、侵襲性ブドウ球菌感染症、悪性黒色腫、がん転移、多発性骨髄腫、アレルギー性鼻炎、腎炎、非ホジキン性リンパ腫、インシュリン非依存性糖尿病（II型）、非小細胞肺癌、臓器移植、骨関節炎、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、卵巣がん、骨ペーチェット病、消化性潰瘍、末梢血管疾患、前立腺がん、逆流性食道炎、腎不全、リウマチ関節炎、精神分裂症、敗血症、敗血症ショック、重症全身性真菌感染症、小細胞肺癌、脊髄損傷、胃がん、全身性エリテマトーサス、一過性脳虚血発作、結核、心弁膜症、血管性／多発梗塞痴呆、創傷治癒、不眠症、関節炎、下垂体ホルモン分泌不全、瀕尿、尿毒症、または神経変成疾患等の疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

【0076】

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60k

g 当たりに換算した量を投与することができる。

一方、例えば、本発明の DNA に対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物を約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明の DNA に対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60 kg として）に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明の DNA に対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明の DNA 発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有する DNA を使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのタンパクを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

本発明の蛋白質および部分ペプチドに対する受容体は次のようにして同定することができる。生理活性ペプチドの受容体の多くは 7 回膜貫通型受容体であり、現在リガンドが未知の多くのオーファン受容体が報告されている。従って、これらのオーファン受容体を CHO 細胞や HEK293 細胞など適当な細胞に発現させてそれらに本発明の蛋白質および部分ペプチドを加えて、特異的なシグナル伝達を誘導するような細胞刺激活性を有するかどうかを調べることにより特異的な受容体を

同定することができる。またゲノムあるいはcDNAライブラリーを適当な動物細胞に導入してそれにラジオアイソトープを標識した本発明の蛋白質あるいは部分ペプチドを加えてその結合を調べることにより、受容体をコードする遺伝子を単離することができる。

さらに本発明は、生理活性ペプチドをコードする遺伝子はしばしばペプチドの配列モチーフが繰り返されるという特徴を利用して、未知の生理活性ペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩を同定する方法、および該方法によって得られた生理活性ペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩なども提供する。

生理活性ペプチドの有する配列モチーフとして、具体的には、例えば RFamide、R Samide、または R Lamide 構造を有する本発明のタンパク質の特徴的な配列である RFG(R/K) 配列または RSG(R/K) 配列または RLG(R/K) 配列または該アミノ酸配列をコードする塩基配列などがあげられる。このような短いアミノ酸配列をコードしうる DNA 配列は生理活性ペプチドの DNA 配列以外でも偶然的にかなりの頻度で出現してくるが、このような配列が繰り返していることを特徴とする配列を探すことによりより高い確率で生理活性ペプチドをコードする DNA を見出すことができる。

より具体的には、RFG(R/K) 配列または RSG(R/K) 配列または RLG(K/R) 配列または該アミノ酸配列を含有する配列およびそれをコードする塩基配列を含有する配列をプローブとしてデータベースの検索をすることにより目的とする遺伝子を取得することができる。該プローブとしては、例えば、ペプチドの配列として RFG(K/R)、RSG(K/R)、RLG(K/R) に対応する DNA の配列として、

RFGK: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)TT(T/C)GG(A/C/G/T)AA(A/G)-3' (配列番号: 20)

RFGR: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)TT(T/C)GG(A/C/G/T)(A/C)G(A/C/G/T)-3' (配列番号: 21)

RSGK: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)(A/T)(C/G)(A/C/G/T)GG(A/C/G/T)AA(A/G)-3' (配列番号: 22)

RSGR: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)(A/T)(C/G)(A/C/G/T)GG(A/C/G/T)(A/C)G(A/C/G/T)-3' (配列番号: 23)

RLGK: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)(T/C)T(A/C/T/G)GG(A/C/G/T)AA(A/G)-3' (配列番号: 24)

RLGR: 5'-(C/A)G(A/C/G/T)(T/C)T(A/C/T/G)GG(A/C/G/T)(A/C)G(A/C/G/T)-3' (配列番号: 25) などがあげられる。

さらに、該配列モチーフを用いてcDNAあるいはゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより目的とする遺伝子を取得することもできる。またジーントラッパーのように上記プローブを使って目的の遺伝子のmRNAを精製し、そのmRNAからcDNAを取得することもできる。さらに他の配列モチーフ（繰り返して遺伝子にコードされているアミノ酸配列または該アミノ酸配列をコードする塩基配列など）を用いてRFamide、RSamideまたはRLamide構造以外の生理活性ペプチドの同定にも使うことができる。

さらにRFamide、RSamideまたはRLamide構造を有するペプチドはペプチドのC末端側にRFamide、RSamideまたはRLamide構造の共通構造を有しているので、RFamide、RSamideまたはRLamide構造を含む抗体を使って、未知のRFamide、RSamideまたはRLamide構造を有するペプチドを探索することが可能である。また、RFamide、RSamideまたはRLamide構造を有するペプチドの受容体の多くは7回膜貫通型受容体である。従って、抗RFamide抗体、抗RSamide抗体または抗RLamide抗体を使って濃縮あるいは分画した動物組織抽出物をリガンドが決定していないオーファン受容体発現細胞に加えて、そのシグナル伝達を調べることにより、オーファン受容体のリガンドを決定することができる。

RFamide、RSamideまたはRLamide構造を有するペプチド以外にも共通配列を有するペプチドは数多く存在するので、この方法はRFamide、RSamideまたはRLamide構造を有するペプチド以外のペプチドにも使うことができる。

【0077】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
I	: イノシン
R	: アデニン (A) またはグアニン (G)
Y	: チミン (T) またはシトシン (C)
M	: アデニン (A) またはシトシン (C)
K	: グアニン (G) またはチミン (T)
S	: グアニン (G) またはシトシン (C)
W	: アデニン (A) またはチミン (T)
B	: グアニン (G)、グアニン (G) またはチミン (T)
D	: アデニン (A)、グアニン (G) またはチミン (T)
V	: アデニン (A)、グアニン (G) またはシトシン (C)

【0078】

RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム

【0079】

Gly	: グリシン
Ala	: アラニン

V a l	: バリン
L e u	: ロイシン
I l e	: イソロイシン
S e r	: セリン
T h r	: スレオニン
C y s	: システイン
M e t	: メチオニン
G l u	: グルタミン酸
A s p	: アスパラギン酸
L y s	: リジン
A r g	: アルギニン
H i s	: ヒスチジン
P h e	: フェニルアラニン
T y r	: チロシン
T r p	: トリプトファン
P r o	: プロリン
A s n	: アスパラギン
G l n	: グルタミン
p G l u	: ピログルタミン酸

【0080】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

後述の実施例1で得られた本発明のタンパク質のアミノ酸配列（ヒト型）を示す。

〔配列番号：2〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のタンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

後述の実施例1で用いられるプライマーF5の塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

後述の実施例 1 で用いられるプライマー F 6 の塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

後述の実施例 1 で用いられるプライマー F 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

後述の実施例 1 で用いられるプライマー R 5 の塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

後述の実施例 3 で用いられるプライマー h R 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

後述の実施例 3 で得られた本発明のタンパク質のアミノ酸配列（ヒト型）を示す。

〔配列番号：9〕

配列番号：8 で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のタンパク質をコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

後述の実施例 4 で用いられるプライマー b F 6 の塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

後述の実施例 4 で用いられるプライマー b F 7 の塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

後述の実施例 4 で用いられるプライマー b R 6 の塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

後述の実施例 4 で用いられるプライマー b R 7 の塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

後述の実施例 4 で得られた本発明のタンパク質のアミノ酸配列（ウシ型）を示す。

〔配列番号：15〕

配列番号：14 で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のタンパク質をコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

後述の実施例 5 で用いられるプライマー r L P R 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕

後述の実施例 5 で用いられるプライマー r L P F 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号 18〕

後述の実施例 5 で得られた本発明のタンパク質のアミノ酸配列（ラット型）を示す。

〔配列番号 19〕

配列番号：18 で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のタンパク質をコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号 20〕

R F G K 配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号 21〕

R F G R 配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号 22〕

R S G K 配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号 20〕

R S G R 配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号 20〕

R L G K 配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号 20〕

R L G R 配列をコードする塩基配列を示す。

後述の実施例 2 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/p hRF1 は、財団法人発酵研究所（I F O）に 1999 年 3 月 5 日から寄託番号 IF0 16265 として寄託されている。

【0081】

【実施例】

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング（Molecular cloning）に記載されている方法に従った。

【0082】

実施例 1 ヒト胎児脳poly(A)⁺RNA画分からのcDNAの合成とRT-PCR法による生理活性ペプチドcDNAの増幅

クローンテック社より購入したヒト胎児脳poly(A)⁺RNA画分1 μ gにプライマーとしてOligod Tプライマー (GibcoBRL社)を加え、モロニイマウス白血病ウイルスの逆転写酵素 (GibcoBRL社)により、添付バッファーを用いてcDNAを合成した。反応後の産物はフェノール：クロロホルム (1：1)で抽出し、エタノール沈殿を行った後、30 μ lのTEに溶解した。調製したcDNA 1 μ lを鋳型として、次の2つのプライマー (F5およびF6)を用いて、PCRによる増幅を行った。

F5 : 5'-GGGCTGCACATAGAGACTTAATTTTAG-3' (配列番号 : 3)

F6 : 5'-CTAGACCACCTCTATATAACTGCCCAT-3' (配列番号 : 4)

反応液の組成は、合成DNAプライマー (F5およびF6) 各20 pM、0.25 mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase 0.5 μ lおよび酵素に付属のバッファー5 μ lで、総反応溶液量は50 μ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキン・エルマー)を用い98℃・10秒、63℃・20秒、72℃・40秒のサイクルを40回繰り返した。

さらにそのPCR産物の1 μ lを鋳型として次の2つのプライマー (F1およびR5)を用いて、nested PCRによる増幅を行った。

F1 : 5'-GCACATAGAGACTTAATTTTAGATTAGAC-3' (配列番号 : 5)

R5 : 5'-CATGCACTTTGACTGGTTTCCAGGTAT-3' (配列番号 : 6)

反応液の組成は、合成DNAプライマー (F1およびR5) 各20 pM、0.25 mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase 0.5 μ lおよび酵素に付属のバッファー5 μ lで、総反応溶液量は50 μ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキン・エルマー社)を用い98℃・10秒、60℃・20秒、72℃・40秒のサイクルを40回繰り返した。増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。

【0083】

実施例2 PCR産物のプラスミドベクターへのサブクロニングおよび挿入 cDNA部分の塩基配列の解読による新規生理活性ペプチド候補クローンの選択

実施例1で行ったPCR後の反応産物は1.2%のアガロースゲルを用いて分離し、目的とする大きさのDNA断片の増幅を確認した後、Quigen PCR purification kit (Quiagen) を用いてDNAを回収した。TAクローニングキット (インビトロゲン社) の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクター pCRTM2.1へサブクロニングした。これを大腸菌 JM109 competent cell (宝 (株)) に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離し、形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109 / p hRF1を得た。

個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置 (クラボウ) を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。残りのDNAの一部をさらにRNase処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社) を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られた塩基配列の情報は、DNASIS (日立システムエンジニアリング社) を用いて行った。決定した塩基配列を〔図1〕に示した。

決定した塩基配列を〔図1〕をもとにホモロジー検索と配列の解析を行った結果、形質転換体E.coli JM109 / p hRF1の保有するプラスミドに挿入されたcDNA断片は、新規生理活性ペプチドをコードすることが分かった。

【0084】

実施例3 ヒト胎児脳cDNAからの生理活性ペプチドcDNAのスプライシングバリエーションの取得

実施例1で作製したヒト胎児脳cDNA 1 mlを鋳型として、次の二つのプライマー (F5、hR1) を用いてPCRによる増幅を行った。

F5:5'-GGGCTGCACATAGAGACTTAATTTTAG-3' (配列番号: 3)

hR1:5'-CAGCTTTAGGGACAGGCTCCAGGTTTC-3' (配列番号: 7)

反応液の組成は合成プライマー (F5およびhR1) 各20 pM、0.25 mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase 0.5 mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は50 mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー) を用い、98℃・10秒、65℃・20秒、72℃・20秒のサイクルを40回くりかえした。増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR産物の増幅を確認した後、反応産物をQIA quick PCR purification Kit (Quiagen) を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定のための反応はBigDye Deoxy Terminator Cycle Sequence Kit (ABI) を用いて行い、蛍光式自動Sequencer (ABI377) を用いて解読した。得られた塩基配列の情報解析はDNA SIS (日立システムエンジニアリング) を用いて行った。その結果、実施例2で得られたcDNAと3'末端側が異なるcDNAが得られた。したがって本実施例で得られたcDNAは、実施例2で得られたcDNAのスプライシングバリエーションである事が分かった。決定した塩基配列 (配列番号: 9) と予測されるアミノ酸の配列 (配列番号: 8) を〔図3〕に示す。

【0085】

実施例4 ウシ視床下部poly(A)⁺RNAからの生理活性ペプチドcDNAの取得

ウシ視床下部poly(A)⁺RNAからのウシ型生理活性ペプチドcDNAの取得はMarathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて行った。Kitに添付のマニュアルにしたがって作製した牛視床下部cDNAを鋳型として、次の4つのプライマー (bF6、bF7、bR6、bR7) を合成し、Kit添付のAP1、AP2の二種類のプライマーと組み合わせPCRによる増幅を行った。

bF6:5'-GCCTAGAGGAGATCTAGGCTGGGAGGA-3' (配列番号: 10)

bF7:5'-GGGAGGAACATGGAAGAAGAAAGGAGC-3' (配列番号: 11)

bR6:5'-GATGGTGAATGCATGGACTGCTGGAGC-3' (配列番号: 12)

bR7:5'-TTCCTCCCAAATCTCAGTGGCAGGTTG-3' (配列番号: 13)

5'側 (N末領域) の増幅のために、まず一回目のPCR反応を合成プライマー (bR6とAP1) を用いて行った。各プライマー 20pMと0.25mMdNTPs、Klen Taq DNA pol

merase 0.5mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98度10秒、72度2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を10倍に希釈し、その1mlを鋳型にして（bR7とAP2）プライマーにて二回目のPCRを行った。各プライマー 20pMと0,25mM dNTPs、Klen Taq DNA polymerase 0.5mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを35回くりかえした。

3'側（C末領域）の増幅のために、まず一回目のPCR反応を合成プライマー（bF6とAP1）を用いて行った。各プライマー 20pMと0,25mM dNTPs、Klen Taq polymerase 0.5mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を10倍に希釈し、その1mlを鋳型にして（bF7とAP2）プライマーにて二回目のPCRを行った。各プライマー 20pMと0,25mM dNTPs、Klen Taq DNA polymerase 0.5mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキンエルマー）を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを35回くりかえした。5'側、3'側それぞれの増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR産物の増幅を確認した後、反応産物をQIA quick PCR purification Kit (Quiagen) を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定のための反応はBig Dye Deoxy Terminator Cycle Sequence Kit (ABI) を用いて行い、蛍光式自動Sequencer (ABI377) を用いて解読した。

得られた塩基配列の情報解析はDNASIS（日立システムエンジニアリング）を用いて行った。決定した塩基配列（配列番号：15）と予測されるアミノ酸の配列

(配列番号：14) を〔図4〕に示す。

【0086】

実施例5 ラット脳poly(A)⁺RNAからの生理活性ペプチドcDNAの取得

ラット脳poly(A)⁺RNAからのラット型生理活性ペプチドcDNAの取得はMarathon cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて行った。Kitに添付のマニュアルにしたがって作製したラット脳cDNAを鋳型として、次の2つのプライマー

rLPR1: 5'-CCCTGGGGCTTCTCTGTCTTCTATGT-3' (配列番号：16)

rLPF1: 5'-AGCGATTCATTTTATTGACTTTAGCA-3' (配列番号：17)

を合成し、Kit添付のAP1, AP2の二種類のプライマーと組み合わせてPCRによる増幅を行った。

5'側(N末領域)の増幅のために、まず一回目のPCR反応をrLPR1とAP1のプライマーセットを用いて行った。各プライマー 200pMと各0.1mM dNTP、Klen Taq DNA polymerase 0.25mlおよび酵素に付属のバッファーで総反応液量は25mlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー(パーキンエルマー)を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を60倍に希釈し、その1mlを鋳型にして一回目のプライマーセット、同様の反応液組成にて二回目のPCRを行った。増幅のためのサイクルは、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・2分30秒のサイクルを38回くりかえした。

3'側(C末領域)の増幅のために、まず一回目のPCR反応をrLPF1とAP1のプライマーセットを用いて行った。反応液組成は5'側(N末領域)の増幅の場合と同様とした。増幅のためのサイクルは、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、65度20秒、72度2分のサイクルを25回くりかえした。次にその一回目のPCR反応液を60倍に希釈し、その1mlを鋳型にしてrLPF1とAP2プライマーにて二回目のPCRを行った。反応液組成は一回目のPCRと同様とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー(パーキンエルマー)を用い、98℃・10秒、72℃・2分のサイクルを5回、続いて98℃・10秒、70℃・2分のサイクルを5回、98℃・10秒、65℃・20秒、72℃・

2分のサイクルを38回くりかえした。5'側、3'側それぞれの増幅産物の確認は1.2%アガロース電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR産物バンドをQIA quick Gel Extraction Kit (Quiagen) を用いて精製し、配列決定を行った。塩基配列決定は実施例3と同様の方法で行った。決定した塩基配列（配列番号：19）と予測されるアミノ酸の配列（配列番号：18）を〔図5〕に示す。

【0087】

【発明の効果】

本発明のタンパク質などは、例えば、神経細胞刺激活性などを有するため、神経疾患治療薬などとして使用することができる。また、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用であり、スクリーニングによって得られる化合物は神経疾患の予防・治療剤として期待される。さらに、本発明のタンパク質に対する抗体は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量などに使用することができる。

【0088】

【配列表】

[Sequence Listing]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Protein and its DNA

<130> A98040

<150> JP 11-060030

<151> 1999-03-08

<160> 19

<210> 1

<211> 180

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

特平 1 1 - 1 0 6 8 1 2

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Leu Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 Ser Ser Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Ala Asp Glu Leu Val Met
 20 25 30
 Ser Asn Leu His Ser Lys Glu Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg
 35 40 45
 Gly Tyr Pro Lys Gly Glu Arg Ser Leu Asn Phe Glu Glu Leu Lys Asp
 50 55 60
 Trp Gly Pro Lys Asn Val Ile Lys Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys
 65 70 75 80
 Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Val
 85 90 95
 Gln Glu Glu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu Pro Leu Arg Ser
 100 105 110
 Gly Arg Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn Leu Pro
 115 120 125
 Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Val Cys Arg Met Leu
 130 135 140
 Ser Asp Leu Cys Gln Gly Ser Met His Ser Pro Cys Ala Asn Asp Leu
 145 150 155 160
 Phe Tyr Ser Met Thr Cys Gln His Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asp Gln
 165 170 175
 Lys Gln Ser Arg
 180

<210> 2

<211> 540

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

ATGGAAATTA TTTCATCAAA ACTATTCATT TTATTGACTT TAGCCACTTC AAGCTTGTTA 60
 ACATCAAACA TTTTGTGTC AGATGAATTA GTGATGTCCA ATCTTCACAG CAAAGAAAAT 120
 TATGACAAAT ATTCTGAGCC TAGAGGATAC CAAAAAGGGG AAAGAAGCCT CAATTTTGAG 180
 GAATTAAG ATTGGGGACC AAAAAATGTT ATTAAGATGA GTACACCTGC AGTCAATAAA 240
 ATGCCACACT CCTTCGCCAA CTTGCCATTG AGATTGTTGGA GGAACGTTCA AGAAGAAAGA 300
 AGTGCTGGAG CAACAGCCAA CCTGCCTCTG AGATCTGGA AGAAATATGGA GGTGAGCCTC 360
 GTGAGACGTG TTCCTAACCT GCCCCAAAGG TTTGGGAGAA CAACAACAGC CAAAAGTGTC 420
 TGCAGGATGC TGAGTGATTT GTGTCAAGGA TCCATGCATT CACCATGTGC CAATGACTTA 480
 TTTTACTCCA TGACCTGCCA GCACCAAGAA ATCCAGAATC CCGATCAAAA ACAGTCAAGG 540

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 3

GGGCTGCACA TAGAGACTTA ATTTTAG

37

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 4

CTAGACCACC TCTATATAAC TGCCCAT

37

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 5

GCACATAGAG ACTTAATTTT AGATTTAGAC

30

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 6

CATGCACTTT GACTGGTTTC CAGGTAT

27

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 7

CAGCTTTAGG GACAGGCTCC AGGTTTC

27

<210> 8

<211> 196

<212> PRT

<213> Human

<400> 8

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Leu Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr

1

5

10

15

Ser Ser Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Ala Asp Glu Leu Val Met

20

25

30

Ser Asn Leu His Ser Lys Glu Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg

35

40

45

Gly Tyr Pro Lys Gly Glu Arg Ser Leu Asn Phe Glu Glu Leu Lys Asp

50

55

60

Trp Gly Pro Lys Asn Val Ile Lys Met Ser Thr Pro Ala Val Asn Lys

65

70

75

80

Met Pro His Ser Phe Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Val

85

90

95

Gln Glu Glu Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ala Asn Leu Pro Leu Arg Ser

100

105

110

Gly Arg Asn Met Glu Val Ser Leu Val Arg Arg Val Pro Asn Leu Pro

115

120

125

Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Val Cys Arg Met Leu

130

135

140

Ser Asp Leu Cys Gln Gly Ser Met His Ser Pro Cys Ala Asn Asp Leu

145

150

155

160

Phe Tyr Ser Met Thr Cys Gln His Gln Glu Ile Gln Asn Pro Asp Gln

165

170

175

Lys Gln Ser Arg Arg Leu Leu Phe Lys Lys Ile Asp Asp Ala Glu Leu

180

185

190

Lys Gln Glu Lys

195

<210> 9

<211> 588

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

ATGGAAATTA TTTCATCAAA ACTATTCATT TTATTGACTT TAGCCACTTC AAGCTTGTTA 60

ACATCAAACA TTTTGTGTC AGATGAATTA GTGATGTCCA ATCTTCACAG CAAAGAAAAT 120

TATGACAAAT ATTCTGAGCC TAGAGGATAC CCAAAAGGGG AAAGAAGCCT CAATTTTGAG 180
 GAATTAAGG ATTGGGGACC AAAAAATGTT ATTAAGATGA GTACACCTGC AGTCAATAAA 240
 ATGCCACACT CCTTCGCCAA CTTGCCATTG AGATTGTTGGA GGAACGTTCA AGAAGAAAGA 300
 AGTGCTGGAG CAACAGCCAA CCTGCCTCTG AGATCTGGAA GAAATATGGA GGTGAGCCTC 360
 GTGAGACGTG TTCCTAACCT GCCCCAAAGG TTTGGGAGAA CAACAACAGC CAAAAGTGTC 420
 TGCAGGATGC TGAGTGATTT GTGTCAAGGA TCCATGCATT CACCATGTGC CAATGACTTA 480
 TTTTACTCCA TGACCTGCCA GCACCAAGAA ATCCAGAATC CCGATCAAAA ACAGTCAAGG 540
 AGACTGCTAT TCAAGAAAAT AGATGATGCA GAATTGAAAC AAGAAAAA 588

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 10

GCCTAGAGGA GATCTAGGCT GGGAGGA

27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 11

GGGAGGAACA TGGAAGAAGA AAGGAGC

27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 12

GATGGTGAAT GCATGGACTG CTGGAGC

27

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 13

TTCCTCCCAA ATCTCAGTGG CAGGTTG

27

<210> 14

<211> 196

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 14

Met Glu Ile Ile Ser Leu Lys Arg Phe Ile Leu Leu Met Leu Ala Thr

1 5 10 15

Ser Ser Leu Leu Thr Ser Asn Ile Phe Cys Thr Asp Glu Ser Arg Met

20 25 30

Pro Asn Leu Tyr Ser Lys Lys Asn Tyr Asp Lys Tyr Ser Glu Pro Arg

35 40 45

Gly Asp Leu Gly Trp Glu Lys Glu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Glu Val

50 55 60

Lys Asp Trp Ala Pro Lys Ile Lys Met Asn Lys Pro Val Val Asn Lys

65 70 75 80

Met Pro Pro Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg Asn Met

85 90 95

Glu Glu Glu Arg Ser Thr Arg Ala Met Ala His Leu Pro Leu Arg Leu

100	105	110
Gly Lys Asn Arg Glu Asp Ser Leu Ser Arg Trp Val Pro Asn Leu Pro		
115	120	125
Gln Arg Phe Gly Arg Thr Thr Thr Ala Lys Ser Ile Thr Lys Thr Leu		
130	135	140
Ser Asn Leu Leu Gln Gln Ser Met His Ser Pro Ser Thr Asn Gly Leu		
145	150	155
Leu Tyr Ser Met Ala Cys Gln Pro Gln Glu Ile Gln Asn Pro Gly Gln		
165	170	175
Lys Asn Leu Arg Arg Arg Gly Phe Gln Lys Ile Asp Asp Ala Glu Leu		
180	185	190
Lys Gln Glu Lys		

195

<210> 15

<211> 588

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 15

<210> 15

<211> 588

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 15

ATGGAATTA TTTCATTAAA ACGATTCATT TTATTGATGT TAGCCACTTC AAGCTTGTTA	60
ACATCAAACA TCTTCTGCAC AGACGAATCA AGGATGCCCA ATCTTTACAG CAAAAAGAAT	120
TATGACAAAT ATTCCGAGCC TAGAGGAGAT CTAGGCTGGG AGAAAGAAAG AAGTCTTACT	180
TTTGAAGAAG TAAAAGATTG GGCTCCAAAA ATTAAGATGA ATAAACCTGT AGTCAACAAA	240
ATGCCACCTT CTGCAGCCAA CCTGCCACTG AGATTTGGGA GGAACATGGA AGAAGAAAGG	300
AGCACTAGGG CGATGGCCCA CCTGCCTCTG AGACTCGGAA AAAATAGAGA GGACAGCCTC	360

TCCAGATGGG TCCCAAATCT GCCCCAGAGG TTTGGAAGAA CAACAACAGC CAAAAGCATT 420
 ACCAAGACCC TGAGTAATTT GCTCCAGCAG TCCATGCATT CACCATCTAC CAATGGGCTA 480
 CTCTACTCCA TGGCCTGCCA GCCCCAAGAA ATCCAGAATC CTGGTCAAAA GAACCTAAGG 540
 AGACGGGGAT TCCAGAAAAT AGATGATGCA GAATTGAAAC AAGAAAAA 588

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artifical Sequence

<220>

<223>

<400> 16

CCCTGGGGCT TCTTCTGTCT TCTATGT 27

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Artifical Sequence

<220>

<223>

<400> 17

AGCGATTCAT TTTATTGACT TTAGCA 26

<210> 18

<211> 203

<212> PRT

<213> Rat

<400> 18

Met Glu Ile Ile Ser Ser Lys Arg Phe Ile Leu Leu Thr Leu Ala Thr

1 5 10 15

Ser Ser Phe Leu Thr Ser Asn Thr Leu Cys Ser Asp Glu Leu Met Met

20 25 30

Pro His Phe His Ser Lys Glu Gly Tyr Gly Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg

35 40 45

Gly Ile Pro Lys Gly Val Lys Glu Arg Ser Val Thr Phe Gln Glu Leu

50 55 60

Lys Asp Trp Gly Ala Lys Lys Asp Ile Lys Met Ser Pro Ala Pro Ala

65 70 75 80

Asn Lys Val Pro His Ser Ala Ala Asn Leu Pro Leu Arg Phe Gly Arg

85 90 95

Asn Ile Glu Asp Arg Arg Ser Pro Arg Ala Arg Ala Asn Met Glu Ala

100 105 110

Gly Thr Met Ser His Phe Pro Ser Leu Pro Gln Arg Phe Gly Arg Thr

115 120 125

Thr Ala Arg Arg Ile Thr Lys Thr Leu Ala Gly Leu Pro Gln Lys Ser

130 135 140

Leu His Ser Leu Ala Ser Ser Glu Ser Leu Tyr Ala Met Thr Arg Gln

145 150 155 160

His Gln Glu Ile Gln Ser Pro Gly Gln Glu Gln Pro Arg Lys Arg Val

165 170 175

Phe Thr Glu Thr Asp Asp Ala Glu Arg Lys Gln Glu Lys Ile Gly Asn

180 185 190

Leu Gln Pro Val Leu Gln Gly Ala Met Lys Leu

195 200

<210> 19

<211> 609

<212> DNA

<213> Rat

<400> 19

ATGGAAATTA TTTCATCAAA GCGATTCATT TTATTGACTT TAGCAACTTC AAGCTTCTTA 60

ACTTCAAACA CCCTTTGTTC AGATGAATTA ATGATGCCCC ATTTTCACAG CAAAGAAGGT 120

TATGGAAAAT ATTACCAGCT GAGAGGAATC CCAAAAGGGG TAAAGGAAAG AAGTGTCACT 180
 TTTCAAGAAC TCAAAGATTG GGGGGCAAAG AAAGATATTA AGATGAGTCC AGCCCCTGCC 240
 AACAAAGTGC CCCACTCAGC AGCCAACCTT CCCCTGAGGT TTGGGAGGAA CATAGAAGAC 300
 AGAAGAAGCC CCAGGGCACG GGCCAACATG GAGGCAGGGA CCATGAGCCA TTTTCCCAGC 360
 CTGCCCCAAA GGT TTGGGAG AACACAGCC AGACGCATCA CCAAGACACT GGCTGGTTTG 420
 CCCCAGAAAAT CCCTGCACTC CCTGGCCTCC AGTGAATCGC TCTATGCCAT GACCCGCCAG 480
 CATCAAGAAA TTCAGAGTCC TGGTCAAGAG CAACCTAGGA AACGGGTGTT CACGGAAACA 540
 GATGATGCAG AAAGGAAACA AGAAAAAATA GGAAACCTCC AGCCAGTCCT TCAAGGGGCT 600
 ATGAAGCTG 609

<210> 20

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 20

MGNTTYGGNA AR

12

<210> 21

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 21

MGNTTYGGNM GN

12

<210> 22

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 22

MGNWSNGGNA AR

12

<210> 23

<211> 12

<212> DNA

<213> Artifical Sequence

<220>

<223>

<400> 23

MGNWSNGGNM GN

12

<210> 24

<211> 12

<212> DNA

<213> Artifical Sequence

<220>

<223>

<400> 24

MGNYTNGGNA AR

12

<210> 25

<211> 12

<212> DNA

<213> Artifical Sequence

<220>

<223>

<400> 25

MGNYTNGGNM GN

12

【0089】

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で得られた本発明のタンパク質（ヒト型）をコードするDNAの塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

【図2】本発明のタンパク質の疎水性プロットを示す図を示す。

【図3】実施例3で得られた本発明のタンパク質（ヒト型）をコードするDNAの塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

【図4】実施例4で得られた本発明のタンパク質（ウシ型）をコードするDNAの塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

【図5】実施例5で得られた本発明のタンパク質（ラット型）をコードするDNAの塩基配列および該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

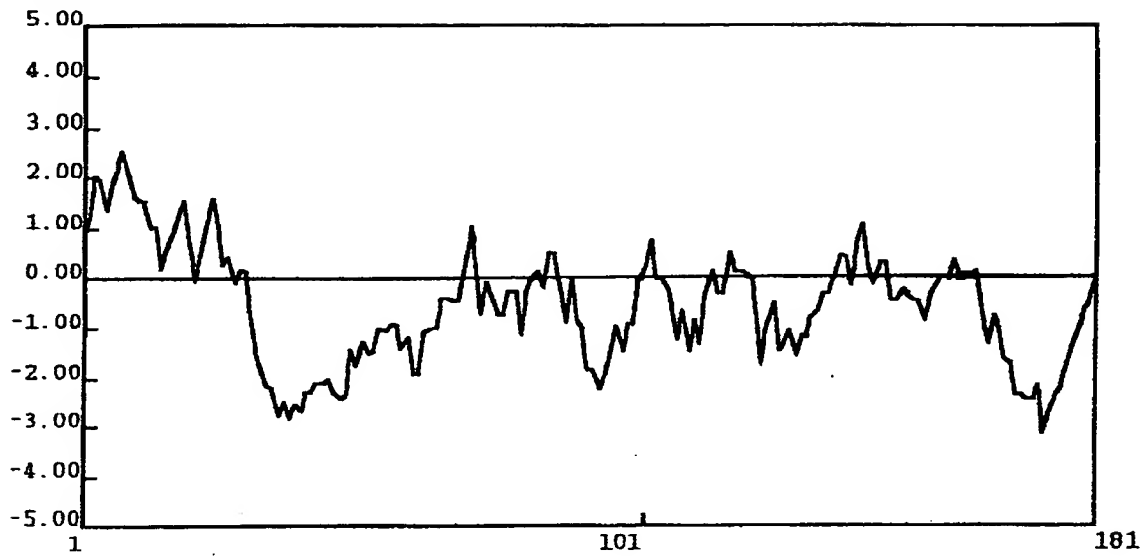
【図6】実施例3、4、5で得られた本発明の蛋白質のアミノ酸配列の比較を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

		9		18		27		36		45		54						
5'	ATG	GAA	ATT	ATT	TCA	TCA	AAA	CTA	TTC	ATT	TTA	TTG	ACT	TTA	GCC	ACT	TCA	AGC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Met	Glu	Ile	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Phe	Ile	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Ser	Ser
			63		72		81		90		99		108					
	TTG	TTA	ACA	TCA	AAC	ATT	TTT	TGT	GCA	GAT	GAA	TTA	GTG	ATG	TCC	AAT	CTT	CAC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Leu	Leu	Thr	Ser	Asn	Ile	Phe	Cys	Ala	Asp	Glu	Leu	Val	Met	Ser	Asn	Leu	His
			117		126		135		144		153		162					
	AGC	AAA	GAA	AAT	TAT	GAC	AAA	TAT	TCT	GAG	CCT	AGA	GGA	TAC	CCA	AAA	GGG	GAA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Ser	Lys	Glu	Asn	Tyr	Asp	Lys	Tyr	Ser	Glu	Pro	Arg	Gly	Tyr	Pro	Lys	Gly	Glu
			171		180		189		198		207		216					
	AGA	AGC	CTC	AAT	TTT	GAG	GAA	TTA	AAA	GAT	TGG	GGA	CCA	AAA	AAT	GTT	ATT	AAG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Arg	Ser	Leu	Asn	Phe	Glu	Glu	Leu	Lys	Asp	Trp	Gly	Pro	Lys	Asn	Val	Ile	Lys
			225		234		243		252		261		270					
	ATG	AGT	ACA	CCT	GCA	GTC	AAT	AAA	ATG	CCA	CAC	TCC	TTC	GCC	AAC	TTG	CCA	TTG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Met	Ser	Thr	Pro	Ala	Val	Asn	Lys	Met	Pro	His	Ser	Phe	Ala	Asn	Leu	Pro	Leu
			279		288		297		306		315		324					
	AGA	TTT	GGG	AGG	AAC	GTT	CAA	GAA	GAA	AGA	AGT	GCT	GGA	GCA	ACA	GCC	AAC	CTG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Arg	Phe	Gly	Arg	Asn	Val	Gln	Glu	Glu	Arg	Ser	Ala	Gly	Ala	Thr	Ala	Asn	Leu
			333		342		351		360		369		378					
	CCT	CTG	AGA	TCT	GGA	AGA	AAT	ATG	GAG	GTG	AGC	CTC	GTG	AGA	CGT	GTT	CCT	AAC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Pro	Leu	Arg	Ser	Gly	Arg	Asn	Met	Glu	Val	Ser	Leu	Val	Arg	Arg	Val	Pro	Asn
			387		396		405		414		423		432					
	CTG	CCC	CAA	AGG	TTT	GGG	AGA	ACA	ACA	ACC	AAA	AGT	GTC	TGC	AGG	ATG	CTG	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	Leu	Pro	Gln	Arg	Phe	Gly	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Lys	Ser	Val	Cys	Arg	Met	Leu
			441		450		459		468		477		486					
	AGT	GAT	TTG	TGT	CAA	GGA	TCC	ATG	CAT	TCA	CCA	TGT	GCC	AAT	GAC	TTA	TTT	TAC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Ser	Asp	Leu	Cys	Gln	Gly	Ser	Met	His	Ser	Pro	Cys	Ala	Asn	Asp	Leu	Phe	Tyr
			495		504		513		522		531		540					
	TCC	ATG	ACC	TGC	CAG	CAC	CAA	GAA	ATC	CAG	AAT	CCC	GAT	CAA	AAA	CAG	TCA	AGG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Ser	Met	Thr	Cys	Gln	His	Gln	Glu	Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Gln	Lys	Gln	Ser	Arg
	TAA	3'																

【図 2】



【図3】

5'	ATG	GAA	ATT	ATT	TCA	TCA	AAA	CTA	TTC	ATT	TTA	TTG	ACT	TTA	GCC	ACT	TCA	AGC	
	Met	Glu	Ile	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Phe	Ile	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Ser	Ser	
	TTG	TTA	ACA	TCA	AAC	ATT	TTT	TGT	GCA	GAT	GAA	TTA	GTG	ATG	TCC	AAT	CTT	CAC	
	Leu	Leu	Thr	Ser	Asn	Ile	Phe	Cys	Ala	Asp	Glu	Leu	Val	Met	Ser	Asn	Leu	His	
	AGC	AAA	GAA	AAT	TAT	GAC	AAA	TAT	TCT	GAG	CCT	AGA	GGA	TAC	CCA	AAA	GGG	GAA	
	Ser	Lys	Glu	Asn	Tyr	Asp	Lys	Tyr	Ser	Glu	Pro	Arg	Gly	Tyr	Pro	Lys	Gly	Glu	
	AGA	AGC	CTC	AAT	TTT	GAG	GAA	TTA	AAA	GAT	TGG	GGA	CCA	AAA	AAT	GTT	ATT	AAG	
	Arg	Ser	Leu	Asn	Phe	Glu	Glu	Leu	Lys	Asp	Trp	Gly	Pro	Lys	Asn	Val	Ile	Lys	
	ATG	AGT	ACA	CCT	GCA	GTC	AAT	AAA	ATG	CCA	CAC	TCC	TTC	GCC	AAC	TTG	CCA	TTG	
	Met	Ser	Thr	Pro	Ala	Val	Asn	Lys	Met	Pro	His	Ser	Phe	Ala	Asn	Leu	Pro	Leu	
	AGA	TTT	GGG	AGG	AAC	GTT	CAA	GAA	GAA	AGA	AGT	GCT	GGA	GCA	ACA	GCC	AAC	CTG	
	Arg	Phe	Gly	Arg	Asn	Val	Gln	Glu	Glu	Arg	Ser	Ala	Gly	Ala	Thr	Ala	Asn	Leu	
	CCT	CTG	AGA	TCT	GGA	AGA	AAT	ATG	GAG	GTG	AGC	CTC	GTG	AGA	CGT	GTT	CCT	AAC	
	Pro	Leu	Arg	Ser	Gly	Arg	Asn	Met	Glu	Val	Ser	Leu	Val	Arg	Arg	Val	Pro	Asn	
	CTG	CCC	CAA	AGG	TTT	GGG	AGA	ACA	ACA	ACA	GCC	AAA	AGT	GTC	TGC	AGG	ATG	CTG	
	Leu	Pro	Gln	Arg	Phe	Gly	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Lys	Ser	Val	Cys	Arg	Met	Leu	
	AGT	GAT	TTG	TGT	CAA	GGA	TCC	ATG	CAT	TCA	CCA	TGT	GCC	AAT	GAC	TTA	TTT	TAC	
	Ser	Asp	Leu	Cys	Gln	Gly	Ser	Met	His	Ser	Pro	Cys	Ala	Asn	Asp	Leu	Phe	Tyr	
	TCC	ATG	ACC	TGC	CAG	CAC	CAA	GAA	ATC	CAG	AAT	CCC	GAT	CAA	AAA	CAG	TCA	AGG	
	Ser	Met	Thr	Cys	Gln	His	Gln	Glu	Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Gln	Lys	Gln	Ser	Arg	
	AGA	CTG	CTA	TTC	AAG	AAA	ATA	GAT	GAT	GCA	GAA	TTG	AAA	CAA	GAA	AAA	TAA	3'	
	Arg	Leu	Leu	Phe	Lys	Lys	Ile	Asp	Asp	Ala	Glu	Leu	Lys	Gln	Glu	Lys	***		

【图4】

	9			18			27			36			45			54		
5'	ATG	GAA	ATT	ATT	TCA	TTA	AAA	CGA	TTC	ATT	TTA	TTG	ATG	TTA	GCC	ACT	TCA	AGC
	Met	Glu	Ile	Ile	Ser	Leu	Lys	Arg	Phe	Ile	Leu	Leu	Met	Leu	Ala	Thr	Ser	Ser
	63			72			81			90			99			108		
	TTG	TTA	ACA	TCA	AAC	ATC	TTC	TGC	ACA	GAC	GAA	TCA	AGG	ATG	CCC	AAT	CTT	TAC
	Leu	Leu	Thr	Ser	Asn	Ile	Phe	Cys	Thr	Asp	Glu	Ser	Arg	Met	Pro	Asn	Leu	Tyr
	117			126			135			144			153			162		
	AGC	AAA	AAG	AAT	TAT	GAC	AAA	TAT	TCC	GAG	CCT	AGA	GGA	GAT	CTA	GGC	TGG	GAG
	Ser	Lys	Lys	Asn	Tyr	Asp	Lys	Tyr	Ser	Glu	Pro	Arg	Gly	Asp	Leu	Gly	Trp	Glu
	171			180			189			198			207			216		
	AAA	GAA	AGA	AGT	CTT	ACT	TTT	GAA	GAA	GTA	AAA	GAT	TGG	GCT	CCA	AAA	ATT	AAG
	Lys	Glu	Arg	Ser	Leu	Thr	Phe	Glu	Glu	Val	Lys	Asp	Trp	Ala	Pro	Lys	Ile	Lys
	225			234			243			252			261			270		
	ATG	AAT	AAA	CCT	GTA	GTC	AAC	AAA	ATG	CCA	CCT	TCT	GCA	GCC	AAC	CTG	CCA	CTG
	Met	Asn	Lys	Pro	Val	Val	Asn	Lys	Met	Pro	Pro	Ser	Ala	Ala	Asn	Leu	Pro	Leu
	279			288			297			306			315			324		
	AGA	TTT	GGG	AGG	AAC	ATG	GAA	GAA	GAA	AGG	AGC	ACT	AGG	GCG	ATG	GCC	CAC	CTG
	Arg	Phe	Gly	Arg	Asn	Met	Glu	Glu	Glu	Arg	Ser	Thr	Arg	Ala	Met	Ala	His	Leu
	333			342			351			360			369			378		
	CCT	CTG	AGA	CTC	GGA	AAA	AAT	AGA	GAG	GAC	AGC	CTC	TCC	AGA	TGG	GTC	CCA	AAT
	Pro	Leu	Arg	Leu	Gly	Lys	Asn	Arg	Glu	Asp	Ser	Leu	Ser	Arg	Trp	Val	Pro	Asn
	387			396			405			414			423			432		
	CTG	CCC	CAG	AGG	TTT	GGA	AGA	ACA	ACA	ACA	GCC	AAA	AGC	ATT	ACC	AAG	ACC	CTG
	Leu	Pro	Gln	Arg	Phe	Gly	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Lys	Ser	Ile	Thr	Lys	Thr	Leu
	441			450			459			468			477			486		
	AGT	AAT	TTG	CTC	CAG	CAG	TCC	ATG	CAT	TCA	CCA	TCT	ACC	AAT	GGG	CTA	CTC	TAC
	Ser	Asn	Leu	Leu	Gln	Gln	Ser	Met	His	Ser	Pro	Ser	Thr	Asn	Gly	Leu	Leu	Tyr
	495			504			513			522			531			540		
	TCC	ATG	GCC	TGC	CAG	CCC	CAA	GAA	ATC	CAG	AAT	CCT	GGT	CAA	AAG	AAC	CTA	AGG
	Ser	Met	Ala	Cys	Gln	Pro	Gln	Glu	Ile	Gln	Asn	Pro	Gly	Gln	Lys	Asn	Leu	Arg
	549			558			567			576			585			594		
	AGA	CGG	GGA	TTC	CAG	AAA	ATA	GAT	GAT	GCA	GAA	TTG	AAA	CAA	GAA	AAA	TAA	3'
	Arg	Arg	Gly	Phe	Gln	Lys	Ile	Asp	Asp	Ala	Glu	Leu	Lys	Gln	Glu	Lys	***	

【図5】

5'	ATG	GAA	ATT	ATT	TCA	TCA	AAG	CGA	TTC	ATT	TTA	TTG	ACT	TTA	GCA	ACT	TCA	AGC	
	Met	Glu	Ile	Ile	Ser	Ser	Lys	Arg	Phe	Ile	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Ser	Ser	
	TTC	TTA	ACT	TCA	AAC	ACC	CTT	TGT	TCA	GAT	GAA	TTA	ATG	ATG	CCC	CAT	TTT	CAC	
	Phe	Leu	Thr	Ser	Asn	Thr	Leu	Cys	Ser	Asp	Glu	Leu	Met	Met	Pro	His	Phe	His	
	AGC	AAA	GAA	GGT	TAT	GGA	AAA	TAT	TAC	CAG	CTG	AGA	GGA	ATC	CCA	AAA	GGG	GTA	
	Ser	Lys	Glu	Gly	Tyr	Gly	Lys	Tyr	Tyr	Gln	Leu	Arg	Gly	Ile	Pro	Lys	Gly	Val	
	AAG	GAA	AGA	AGT	GTC	ACT	TTT	CAA	GAA	CTC	AAA	GAT	TGG	GGG	GCA	AAG	AAA	GAT	
	Lys	Glu	Arg	Ser	Val	Thr	Phe	Gln	Glu	Leu	Lys	Asp	Trp	Gly	Ala	Lys	Lys	Asp	
	ATT	AAG	ATG	AGT	CCA	GCC	CCT	GCC	AAC	AAA	GTG	CCC	CAC	TCA	GCA	GCC	AAC	CTT	
	Ile	Lys	Met	Ser	Pro	Ala	Pro	Ala	Asn	Lys	Val	Pro	His	Ser	Ala	Ala	Asn	Leu	
	CCC	CTG	AGG	TTT	GGG	AGG	AAC	ATA	GAA	GAC	AGA	AGA	AGC	CCC	AGG	GCA	CGG	GCC	
	Pro	Leu	Arg	Phe	Gly	Arg	Asn	Ile	Glu	Asp	Arg	Arg	Ser	Pro	Arg	Ala	Arg	Ala	
	AAC	ATG	GAG	GCA	GGG	ACC	ATG	AGC	CAT	TTT	CCC	AGC	CTG	CCC	CAA	AGG	TTT	GGG	
	Asn	Met	Glu	Ala	Gly	Thr	Met	Ser	His	Phe	Pro	Ser	Leu	Pro	Gln	Arg	Phe	Gly	
	AGA	ACA	ACA	GCC	AGA	CGC	ATC	ACC	AAG	ACA	CTG	GCT	GGT	TTG	CCC	CAG	AAA	TCC	
	Arg	Thr	Thr	Ala	Arg	Arg	Ile	Thr	Lys	Thr	Leu	Ala	Gly	Leu	Pro	Gln	Lys	Ser	
	CTG	CAC	TCC	CTG	GCC	TCC	AGT	GAA	TCG	CTC	TAT	GCC	ATG	ACC	CGC	CAG	CAT	CAA	
	Leu	His	Ser	Leu	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Leu	Tyr	Ala	Met	Thr	Arg	Gln	His	Gln	
	GAA	ATT	CAG	AGT	CCT	GGT	CAA	GAG	CAA	CCT	AGG	AAA	CGG	GTG	TTT	ACG	GAA	ACA	
	Glu	Ile	Gln	Ser	Pro	Gly	Gln	Glu	Gln	Pro	Arg	Lys	Arg	Val	Phe	Thr	Glu	Thr	
	GAT	GAT	GCA	GAA	AGG	AAA	CAA	GAA	AAA	ATA	GGA	AAC	CTC	CAG	CCA	GTC	CTT	CAA	
	Asp	Asp	Ala	Glu	Arg	Lys	Gln	Glu	Lys	Ile	Gly	Asn	Leu	Gln	Pro	Val	Leu	Gln	
	GGG	GCT	ATG	AAG	CTG	TGA	3'												
	Gly	Ala	Met	Lys	Leu	***													

【図 6】

hLPLRF.aa	1	MEIISKRFI	LTATSSLL	TSNIFQDEI	VSNIHSKEN	YDKYSEPRG	50
bLPLRF.aa	1	MEIISKRFI	LTATSSLL	TSNIFQDEI	RMPIHSKEN	YDKYSEPRG	50
rLPLRF.aa	1	MEIISKRFI	LTATSSLL	TSNIFQDEI	MEPIHSKEN	YDKYSEPRG	50
hLPLRF.aa	51	YFKG	ER	SLNFEELKDW	GPRNVILKMSI	ANLPLRFGRN	100
bLPLRF.aa	51	LGWEX	ER	SLNFEELKDW	APK--IKNNK	ANLPLRFGRN	100
rLPLRF.aa	51	PKGVKER	SVNFEELKDW	GPRNVILKMSI	APANKVPHSA	ANLPLRFGRN	100
hLPLRF.aa	101	VOERSAGAT	ANLPLRFGRN	MEMSILVRRVP	NLPQRFGRIT	TAKSVCRMIS	150
bLPLRF.aa	101	MEERSIFRAM	ANLPLRFGRN	REDSILVRRVP	NLPQRFGRIT	TAKSITKTLS	150
rLPLRF.aa	101	IFDRSPRAR	ANM-----	EAGTMSHIF	SLPQRFGRIT	ARRITKTIA	150
hLPLRF.aa	151	DIQCSMHSH	CANILEYSMT	COHQEIQNP	QKQSRRLIFK	KIDDAELKQE	200
bLPLRF.aa	151	NIQCSMHSH	STNCLLYSMA	COHQEIQNP	QKQSRRLIFK	KIDDAELKQE	200
rLPLRF.aa	151	GLFQKSHSL	ASSESLYAMI	ROHQEIQNP	QKQSRRLIFK	ETDDAEKQE	200
hLPLRF.aa	201	K*	-----	-----	-----	-----	250
bLPLRF.aa	201	K*	-----	-----	-----	-----	250
rLPLRF.aa	201	KIGNLPVLQ	GAMKL*	-----	-----	-----	250

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規タンパク質などの提供。

【解決手段】 新規タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該タンパク質の製造法、該タンパク質等を含有してなる医薬、該タンパク質に対する抗体、該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法／スクリーニング用キット、該スクリーニングによって得られる化合物、該化合物を含有してなる医薬など。

【効果】 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドなどは、例えば、神経疾患治療剤などとして使用することができる。また、本発明の抗体は、被検液中の本発明のタンパク質の定量などに使用することができる。さらに、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物をスクリーニングするための試薬として有用である。

【選択図】 なし

特平 11-106812

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日	1992年 1月22日
[変更理由]	住所変更
住 所	大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
氏 名	武田薬品工業株式会社